抑制CaMKII减轻线粒体氧化应激可改善离体心脏缺血再灌注损伤

孔令恒[1],陈玉龙[2],孙 娜[1],魏 明[1],朱娟霞[1],苏兴利[1]
西安医学院[1]基础医学部基础医学研究所,[2]基础与转化医学研究所,陕西 西安 710021

摘要:目的 探讨钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶Ⅱ(CaMKII)在离体心脏缺血再灌注(IR)损伤中的作用和可能机制。**方法** 采用大鼠离体心脏缺血再灌注(IR 45 min/120 min)模型,将40只大鼠随机分为对照组(Control)、KN-93药物对照组(2.5 μmol/L KN-93)、IR组和CaMKII特异性抑制剂KN-93干预缺血再灌注组(KN-93+IR),以左室心脏功能、冠脉流出液中乳酸脱氢酶(LDH)活性和心肌肌钙蛋白(cTnI)含量、心肌梗死面积评价心脏损伤程度,Western-blot检测CaMKII磷酸化(p-CaMKII)、CaMKII氧化(ox-CaMKII)和PLN磷酸化(p-PLN)蛋白的表达,试剂盒检测线粒体超氧化物歧化酶(SOD)的活性和丙二醛(MDA)的含量。**结果** 与Control组相比,KN-93组各项指标均无明显变化;IR组心脏功能、线粒体SOD的活性降低($P<0.01$),而心肌梗死面积、冠脉流出液中LDH活性和cTnI含量、p-CaMKII、ox-CaMKII和p-PLN的表达、线粒体MDA的含量均明显升高($P<0.01$);KN-93干预IR组可明显改善心脏功能($P<0.01$),增加线粒体SOD活性,减小心肌梗死面积、LDH活性、cTnI含量、p-CaMKII、ox-CaMKII和p-PLN的表达以及线粒体MDA含量($P<0.01$)。**结论** CaMKII参与离体心脏缺血再灌注损伤,抑制CaMKII可通过降低线粒体氧化应激进而减轻离体心脏缺血再灌注损伤。

关键词:钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶Ⅱ;心脏缺血再灌注损伤;线粒体;超氧化物歧化酶;丙二醛

Inhibition of CaMKII alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing mitochondrial oxidative stress in isolated perfused rat heart

KONG Lingheng[1], CHEN Yulong[2], SUN Na[1], WEI Ming[1], ZHU Juanxia[1], SU Xingli[1]
Institute of Basic Medical Science, School of Basic Medical Sciences[1], Institute of Basic and Translational Medicine[2], Xi'an Medical College, Xi'an 710021, China

Abstract: Objective To investigate the role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in myocardial ischemia-reperfusion (IR) injury in isolated perfused rat heart and explore the underlying mechanisms. **Methods** An ischemia-reperfusion (IR) model was prepared using isolated rat hearts perfused with Krebs-Henseleit solution were randomly divided into control group, 2.5 μmol/L KN-93 group, IR (induced by ischemia for 45 min followed by reperfusion for 120 min) group and KN-93 + IR group. The myocardial performance was evaluated by assessing the left ventricular pressure. Lactate dehydrogenase (LDH) activity and cTnI content in the coronary flow and the infarct size were determined to evaluate the myocardial injury. The phosphorylation of CaMKII (p-CaMKII) and PLN (p-PLN) and oxidation of CaMKII (ox-CaMKII) were measured with Western blotting. The activity of mitochondrial superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) were determined using ELISA. **Results** Compared with the control group, KN-93 treatment at 2.5 μmol/L produced no significant effects on cardiac function or performance in rat hearts without IR injury. Myocardial IR injury significantly decreased myocardial performance and mitochondrial SOD activity in the perfused hearts ($P<0.01$) and caused significantly increased infarct size, LDH activity, cTnI content, expressions of p-CaMKII, ox-CaMKII and p-PLN, and also increased mitochondrial MDA content ($P<0.01$). KN-93 treatment at 2.5 μmol/L administered before ischemia and before reperfusion markedly attenuated such changes induced by ischemia and reperfusion ($P<0.01$). **Conclusion** CaMKII participates in myocardial IR injury in isolated rat heart, and inhibiting CaMKII can alleviate myocardial injury by relieving mitochondrial oxidation stress.

Keywords: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; myocardial ischemia reperfusion injury; mitochondria; superoxide dismutase; malondialdehyde

心肌缺血再灌注是急性心梗溶栓、冠脉血管成形术和心脏停跳手术等心血管疾病手术治疗中不可避免的过程[1]。目前关于心肌缺血再灌注损伤机制的研究主要集中在钙超载、氧化应激、细胞凋亡、炎症反应、线粒体功能障碍以及自噬[2-8]。尽管有大量文献报道了心肌缺血再灌注损伤的机制,但临床转化有限,应用价值不高,治疗效果并不理想。

钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶Ⅱ(CaMKII)是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，有α、β、δ和γ 4种亚型，其中心脏上主要分布δ亚型[9-11]。CaMKII通过自身磷酸化或活性氧(ROS)氧化M281/282位点激活[12-14]。激活的CaMKII可磷酸化L型钙通道、肌浆网雷诺丁受体(RyR)和钙泵(SERCA2a)调节心肌细胞内钙变化[15-18]。

CaMKII的特异性抑制剂KN-93，可与钙调蛋白(CaM)竞争性结合CaMKII的结合区，抑制CaMKII的活性[1]。根据以往文献的报道，CaMKII参与心肌损伤的机制主要是调控L型钙通道和肌质网功能加重胞内钙超载[15-18]，而对线粒体功能特别是在调控线粒体内氧化还原反应中所发挥的作用还未见报道。本研究采用离体心脏缺血再灌注模型，观察KN-93抑制CaMKII后对线粒体氧化应激损伤的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

40只健康雄性SD大鼠购买于第四军医大学实验动物中心，体质量250~300 g。氯化三苯基四氮唑(TTC)购买于Sigma，KN-93购自Tocris，依据文献确定其浓度[19]，乳酸脱氢酶试剂盒、SOD试剂盒和MDA试剂盒均购于南京建成生物公司，Cell Signaling Technology公司购买磷酸化CaMKII、PLN、CaMKII和GAPDH抗体，Badrilla购买PLN-Thr17位点磷酸化抗体，氧化CaMKII抗体购自Millipore。正常灌流液Krebs-Henseleit(KH solution)的成分和含量(mmol/L)：NaCl 118，KCl 4.7，KH_2PO_4 1.2，$MgSO_4$ 1.2，$CaCl_2$ 1.25，Glucose 11，$NaHCO_3$ 25。实验开始前45 min用混合气体(95% O_2/5% CO_2, v/v)向正常KH液中通气至实验结束，灌流液pH维持在7.35~7.45，温度保持在37 ℃。

1.2 方法

1.2.1 实验分组和模型的制备　实验时，SD大鼠快速腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)和肝素(500 U/kg)，麻醉好后迅速沿剑突两侧剪开胸腔，暴露心脏，并立即取下心脏放置于预冷的4 ℃ KH液中。用0号线将保留的主动脉根部快速结扎在Langendorff灌流管口，灌流液从主动脉口逆行灌注，灌注压维持在80 mmHg。将乳胶球囊刺破二尖瓣插入左心室，通过Labchart 7软件记录心脏功能。控制球囊内液体量使左室舒张末压保持在0~5 mmHg，使心脏稳定15 min。待其平衡后，随机分为4组(n=10)：对照组(Control)、KN-93药物对照组(KN-93)、缺血再灌注组(IR)和KN-93干预缺血再灌注组(KN-93+IR)。Control组正常灌注165 min；KN-93组用含2.5 μmol/L KN-93的KH液灌注6 min，恢复正常KH液灌注159 min；IR组缺血45 min，再灌注120 min；KN-93+IR组先用含2.5 μmol/L KN-93的KH液处理1 min，缺血45 min，再用含2.5 μmol/L KN-93的KH液处理5 min，恢复KH液灌注114 min。

1.2.2 心脏功能的监测　采用Labchart 7软件，整个实验过程中监测左室内压(LVP)、左室收缩峰压(LVPSP)和左室舒张末压(LVEDP)的变化，左室发展压(LVDP)的变化采用LVPSP和LVEDP的差值表示。LVDP和LVEDP作为评价心脏功能的指标。

1.2.3 心肌梗死面积的检测　再灌注结束后，立刻将心脏冻存于−80 ℃冰箱60 min；垂直于心脏纵轴方向切成连续6片厚度约为1 mm的切片，放入盛有1% TTC溶液的24孔板中，37 ℃恒温水浴避光孵育15 min；4%多聚甲醛固定2 d；采用数码相机拍照，Image J软件计算心肌梗死面积。白色区代表梗死心肌，红色区代表正常心肌，心肌梗死比例=(梗死区面积/心肌总面积)×100%。

1.2.4 LDH活性和cTnI的检测　收集各组心脏再灌注前10 min内的冠脉流出液，严格按照南京建成生物公司提供的LDH试剂盒和cTnI检测试剂盒说明书操作，读取各组冠脉流出液的吸光值并换算成相应的LDH活性。

1.2.5 Western blot　剪取各组大鼠左室相同重量的心肌组织，加入含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和RIPA裂解液(强)的混合液中冰上裂解30 min，12 000 g，4 ℃离心20 min，取上清，BCA蛋白定量；配制5 %浓缩胶和10%分离胶，恒压90 V湿转70 min将蛋白转移至PVDF膜；用TBST配制5%脱脂奶粉室温封闭90 min，分别用p-CaMKII、ox-CaMKII、CaMKII、p-PLN、PLN(1∶1000)以及GAPDH(1∶4000)一抗4 ℃孵育过夜；第2天，TBST洗膜6次，5 min/次，用HRP标记的二抗(1∶5000)室温孵育90 min，TBST洗膜6次，5 min/次；ECL显色，曝光后扫描，用Image J图像分析软件对各组条带进行灰度值分析并统计，以GAPDH作为内参。

1.2.6 线粒体SOD活性和MDA含量检测　再灌流结束后，分别提取各组心肌线粒体，方法如下：各组分别称取40 mg心肌组织，放入盛有500 μL预冷的PBS的1.5 mL离心管中，在冰上剪碎，800 g 4 ℃离心60 s，弃上清，沉淀中加入500 μL含PMSF的线粒体分离试剂，冰上匀浆，1000 g 4 ℃离心5 min，上清转移至另一离心管中，12 000 g 4 ℃离心15 min，所得沉淀即为线粒体。按照南京建成生物公司提供的线粒体MDA和SOD试剂盒说明书操作，检测MDA含量(nmol/mg)和SOD活性(U/mg)。

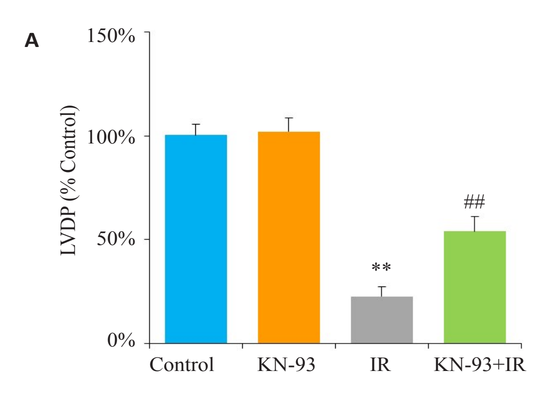
1.3 统计学分析

结果采用均数±标准差表示，使用SPSS 13.0统计软件进行数据分析，单因素方差分析用于各组间差异比较，两组之间的比较采用Tukey检验，P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 KN-93可改善离体心脏缺血再灌注心脏功能

如图1所示，Control组和KN-93组在整个灌注期LVDP和LVEDP均无明显变化，且两组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）；与Control组相比，IR组心脏缺血45 min后再灌注，LVDP显著降低，LVEDP显著升高（$P<0.01$）；而与IR组心脏相比，KN-93+IR组心脏再灌注后LVDP明显升高，LVEDP显著降低（$P<0.01$）。



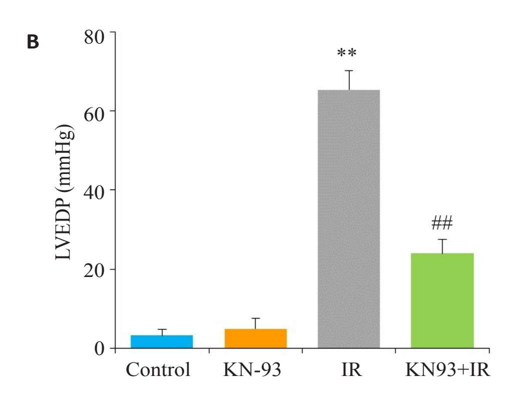


图1 缺血再灌注末左室功能的变化

Fig.1 Left ventricular function of isolated rat hearts at the end of ischemia-reperfusion (IR) in each group. **A**: Recovery of left ventricular developed pressure (LVDP) at the end of reperfusion. **B**: Level of left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) at the end of reperfusion. **$P<0.01$ IR *vs* control, ##$P<0.01$ KN-93+IR *vs* IR.

2.2 KN-93可减少离体心脏缺血再灌注心肌梗死面积和cTnI的释放

如图2所示，Control组和KN-93组心脏未见梗死区域，冠脉流出液中LDH活性和cTnI的含量很低；与Control组相比，IR组心脏心肌梗死面积明显增大，冠脉流出液中LDH活性和cTnI的含量明显升高（$P<0.01$）；而KN-93+IR组心脏心肌梗死面积明显减小，冠脉流出液中LDH活性和cTnI含量均显著降低（$P<0.01$）。

2.3 KN-93可抑制离体心脏缺血再灌注损伤中CaMKII和PLN的活性

如图3，Western blot结果显示，与Control组相比，KN-93组ox-CaMKII、p-CaMKII和p-PLN的水平没有明显变化（$P>0.05$）；IR组心脏ox-CaMKII和p-CaMKII的表达明显增加，其底物PLN的磷酸化水平也明显增加（$P<0.01$）；而与IR组相比，KN-93+IR组心脏ox-CaMKII、p-CaMKII和p-PLN的表达均明显降低（$P<0.01$）。

2.4 KN-93可减轻离体心脏缺血再灌注损伤中线粒体氧化应激

如图4所示，与Control组相比，KN-93组线粒体SOD活性和MDA含量均没有明显变化（$P>0.05$）；IR组线粒体SOD活性明显降低，MDA含量明显增加（$P<0.01$）；与IR组相比，KN-93+IR组可明显增加线粒体SOD活性，降低MDA含量（$P<0.01$）。

3 讨论

缺血心肌再灌注是目前治疗缺血性心脏病的最有效方法，然而，再灌注本身会对缺血心肌造成损伤，增加细胞凋亡和坏死，引起心脏功能障碍和恶性心律失常，严重影响患者的预后。近年来，CaMKII在心血管疾病中发挥的重要作用已经成为研究的热点[20-22]。大量研究报道CaMKII参与心肌缺血再灌注损伤、心肌梗死、心力衰竭和糖尿病心肌病等病理性过程的发生、发展[23-27]，其机制主要集中在CaMKII可增加心肌细胞内钙超载引起损伤，而对于心肌内氧化应激的作用报道较少。

本研究采用离体心脏缺血再灌注模型，观察了临床上反映心脏功能的相关指标，如心脏舒缩功能、心肌梗死面积、冠脉流出液中LDH活性和cTnI的含量以评价心肌损伤程度，并检测了CaMKII磷酸化和氧化的表达及其底物PLN磷酸化水平的变化来反映CaMKII活性，进而评价CaMKII在心脏缺血再灌注过程中的作用。实验结果证实，KN-93干预IR后，可明显改善心脏功能，减小心肌梗死面积，降低冠脉流出液中LDH活性和cTnI的含量，结果与以往的大量文献报道一致[4, 19]，这说明抑制CaMKII可显著减轻心肌损伤。同时，IR组可明显增加CaMKII磷酸化和氧化表达，其底物PLN的磷酸化水平也明显增加，而KN-93抑制CaMKII后，CaMKII磷酸化和氧化表达均明显降低，PLN磷酸化水平也随之降低，这说明KN-93可同时抑制CaMKII的两种激活方式减轻IR引起的心肌损伤。

线粒体作为心肌细胞内产生能量的主要场所，在心肌细胞能量代谢过程中发挥至关重要的作用。心肌缺血再灌注破坏了线粒体结构和氧化磷酸化过程，增加了线粒体氧化应激损伤，导致氧自由基大量堆积，ATP合

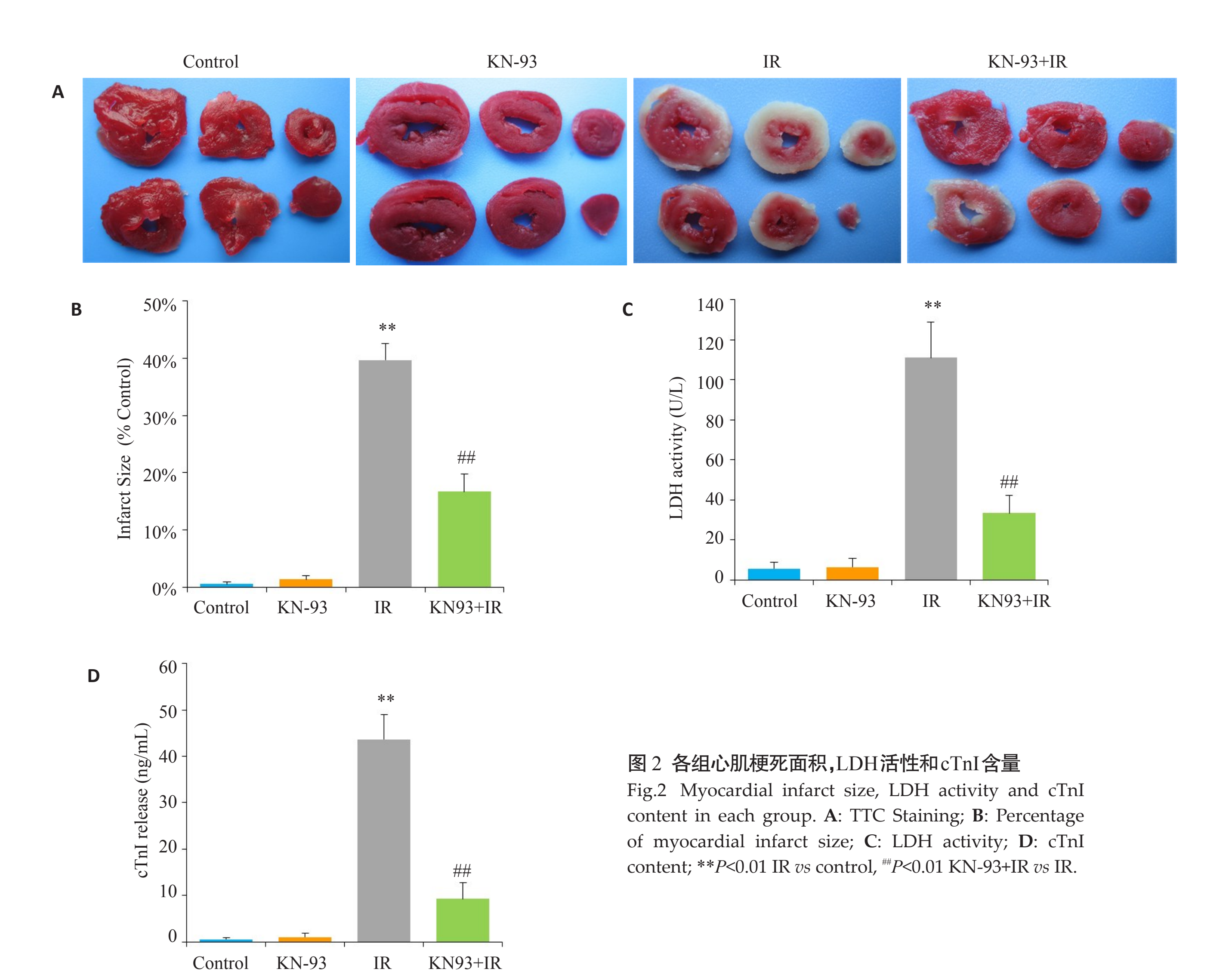


图 2 各组心肌梗死面积，LDH活性和cTnI含量

Fig.2 Myocardial infarct size, LDH activity and cTnI content in each group. **A**: TTC Staining; **B**: Percentage of myocardial infarct size; **C**: LDH activity; **D**: cTnI content; $^{**}P<0.01$ IR *vs* control, $^{\#\#}P<0.01$ KN-93+IR *vs* IR.

成减少，膜通透性转换孔开放，细胞凋亡的启动[28-29]。因此，抑制线粒体氧化应激可有效减轻心脏缺血再灌注损伤。SOD活性可反映线粒体清除氧自由基的能力，而MDA含量可间接反映脂质过氧化的程度。本实验结果表明，离体心脏缺血再灌注后，线粒体SOD活性明显降低，MDA含量却显著升高，说明线粒体氧化应激程度明显增加，而KN-93干预IR后可增加线粒体SOD活性，降低MDA含量，这说明抑制CaMKII可减轻线粒体氧化应激。

综上所述，本实验进一步明确CaMKII参与了心脏缺血再灌注损伤，并证明KN-93抑制CaMKII磷酸化和氧化激活后可通过降低线粒体氧化应激改善心脏损伤，这为CaMKII参与心脏缺血再灌注损伤提供了新的实验依据。后续工作还需进一步阐明CaMKII磷酸化和氧化两种激活方式在介导线粒体氧化应激中的不同作用及分子机制，这将为心脏缺血再灌注保护提供新的思路。

参考文献：

[1] 孔令恒, 刘 哲, 张建英, 等. 心肌缺血－再灌注-钙超载损伤的基础与临床研究[J]. 中国体外循环杂志, 2015, 13(4): 253-6.

[2] Garcia- Dorado D, Ruiz-Meana M, Inserte JA, et al. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion[J]. Cardiovasc Res, 2012, 94(2): 168-80.

[3] Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 61(0): 473-501.

[4] Salas MA, Valverde CA, Sanchez G, et al. The signaling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 48(6): 1298-306.

[5] Gray CB, Suetomi T, Xiang S, et al. CaMKII delta subtypes differentially regulate infarct formation following *ex vivo* myocardial ischemia/reperfusion through NF-kappa B and TNF-alpha[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 103(103): 48-55.

[6] Ong SB, Hausenloy DJ. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease[J]. Cardiovasc Res, 2010, 88(1): 16-29.

[7] Xu J, Qin XH, Cai XQ, et al. Mitochondrial JNK activation triggers autophagy and apoptosis and aggravates myocardial injury following ischemia/reperfusion[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Mol Basis Dis, 2015, 1852(2, SI): 262-70.

[8] Yu SY, Dong B, Zhou SH, et al. LncRNA MALAT1: A potential regulator of autophagy in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Int J Cardiol, 2017, 247(5): 25.

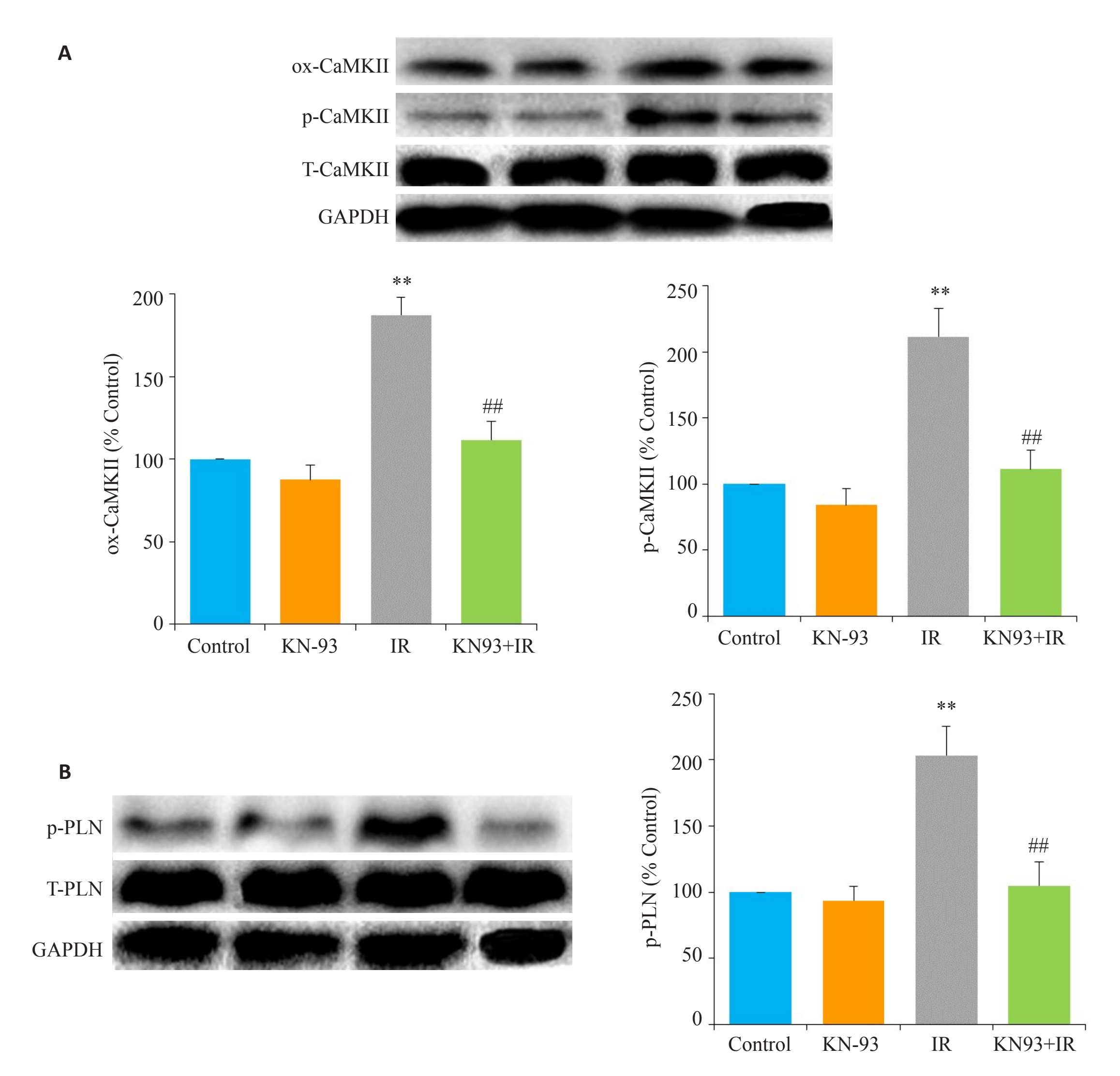


图 3 各组磷酸化CaMKII和PLN的表达

Fig.3 Western blotting for detecting expressions of p-CaMKII (**A**) and p-PLN (**B**) in each group. ***P*<0.01 IR *vs* control, ##*P*<0.01 KN-93+IR *vs* IR.

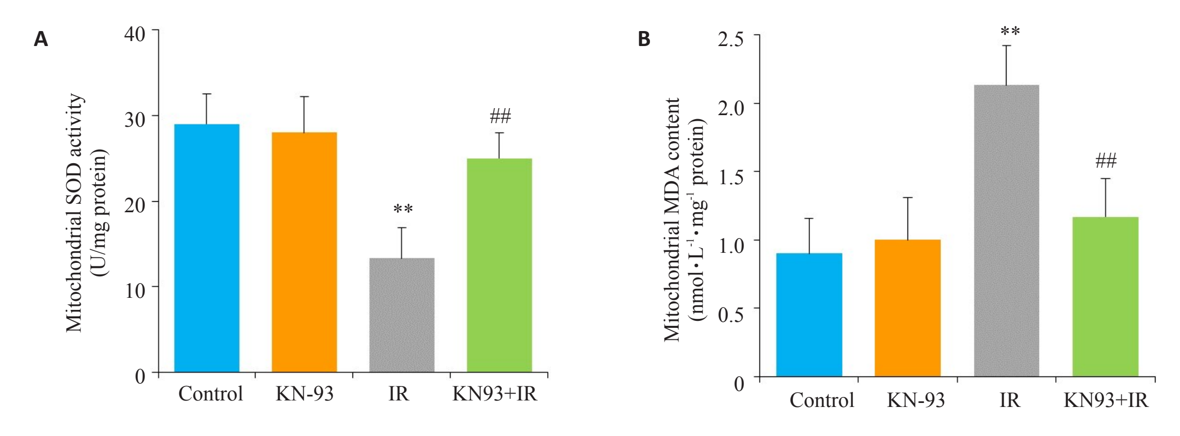


图 4 线粒体SOD活性和MDA含量

Fig.4 Mitochondrial superoxide dismutase (SOD) activity (**A**) and malondialdehyde (MDA) content (**B**) in each group. ***P*<0.01 IR *vs* control, ##*P*<0.01 KN-93+IR *vs* IR.

[9] Anderson ME. Pathways for CaMKII activation in disease[J]. Heart Rhythm, 2011, 8(9): 1501-3.

[10] Kreusser MM, Lehmann LH, Wolf N, et al. Inducible cardiomyocyte-specific deletion of CaM kinase II protects from pressure overload-induced heart failure[J]. Basic Res Cardiol, 2016, 111(6): 10.

[11] Perkin J, Slater R, Del Favero G, et al. Phosphorylating titin's

cardiac N2B element by ERK2 or CaMKII delta lowers the single molecule and cardiac muscle force[J]. Biophys J, 2015, 109(12): 2592-601.

[12] Zhang PY. CaMKII: the molecular villain that aggravates cardiovascular disease[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(3): 815-20.

[13] Monnerat G, Alarcon ML, Vasconcellos LR, et al. Macrophage-dependent IL-1 beta production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice[J]. Nat Commun, 2016, 7(1): 10.

[14] Mattiazzi A, Bassani RA, Escobar AL, et al. Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 308(10): H1177-91.

[15] Di Carlo MN, Said M, Ling HY, et al. CaMKII-dependent phosphorylation of cardiac ryanodine receptors regulates cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 74 (74): 274-83.

[16] Helms AS, Alvarado FJ, Yob J, et al. Genotype-Dependent and -Independent calcium signaling dysregulation in human hypertrophic cardiomyopathy[J]. Circulation, 2016, 134(22): 1738-48.

[17] Li YE, Sirenko S, Riordon DR, et al. CaMKII-dependent phosphorylation regulates basal cardiac pacemaker function via modulation of local Ca^{2+} releases[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 311(3): H532-44.

[18] Popescu I, Galice S, Mohler PJ, et al. Elevated local [Ca^{2+}] and CaMKII promote spontaneous Ca^{2+} release in ankyin-B-deficient hearts[J]. Cardio Res, 2016, 111(3): 287-94.

[19] Vila-Petroff M, Salas MA, Said MA, et al. CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury[J]. Cardio Res, 2007, 73(4): 689-98.

[20] Kong LH, Gu XM, Wu F, et al. CaMKII inhibition mitigates ischemia/reperfusion-elicited calpain activation and the damage to membrane skeleton proteins in isolated rat hearts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(3): 687-92.

[21] Zhong P, Quan DJ, Peng JY, et al. Role of CaMKII in free fatty acid/hyperlipidemia-induced cardiac remodeling both *in vitro* and *in vivo*[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 109(109): 1-16.

[22] Feng Y, Cheng J, Wei BZ, et al. CaMKII inhibition reduces isoproterenol- induced ischemia and arrhythmias in hypertrophic mice[J]. Oncotarget, 2017, 8(11): 17504-9.

[23] Ling H, Gray CB, Zambon AC, et al. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II δ mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through nuclear factor-κB[J]. Circ Res, 2013, 112(6): 935-44.

[24] Luo M, Guan XQ, Luczak ED, et al. Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII[J]. J Clin Invest, 2013, 123(3): 1262-74.

[25] Ling HY, Zhang T, Pereira L, et al. Requirement for Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice[J]. J Clin Invest, 2009, 119(5): 1230-40.

[26] Daniels L, Bell JR, Delbridge LM, et al. The role of CaMKII in diabetic heart dysfunction[J]. Heart Fail Rev, 2015, 20(5): 589-600.

[27] Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, et al. Diastolic dysfunction in prediabetic male rats: Role of mitochondrial oxidative stress[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 311(4): H927-43.

[28] Morciano G, Bonora M, Campo G, et al. Mechanistic role of mPTP in ischemia-reperfusion injury[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 982(8): 169-89.

[29] Zhang P, Lu Y, Yu D, et al. TRAP1 provides protection against myocardial ischemia-reperfusion injury by ameliorating mitochondrial dysfunction[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(5): 2072-82.